



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118583** (13) **C2**
(51) МПК**A61K 9/127** (2006.01)**A61K 47/44** (2017.01)**A61K 38/41** (2006.01)**A61P 27/12** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД****(21)** Номер заявки: **а 2016 10776****(22)** Дата подання заявки: **27.10.2016****(24)** Дата, з якої є чинними
права на винахід: **11.02.2019****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **10.05.2018, Бюл.№ 9****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.02.2019, Бюл.№ 3****(72)** Винахідник(и):**Григор'єва Ганна Савівна (UA),
Кацай Олексій Григорович (UA),
Краснопольський Юрій Михайлович
(UA),****Прохоров Віталій Валентинович (UA),
Хромов Олександр Станіславович (UA),
Пасєчнікова Наталія Володимирівна
(UA),
Добреля Наталія Володимирівна (UA)****(73)** Власник(и):**ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАНОМЕДТРАСТ",
вул. Старокиївська, буд. 26, м. Київ, 04116,
Україна (UA)****(74)** Представник:**Боровик Петро Антонович, реєстр. №166****(56)** Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:**EA 022183 C2****UA 111762 C2****RU 2 110 990 C1****Zhang J., Guan P., Wang T. at al. Freeze-
dried liposomes as potential carriers for ocular
administration of cytochrome c against selenite
cataract formation //J. Pharmacy and
Pharmacology, 2009. – V. 61. - №9. – P.
1171-1178.****(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО
МІСТИТЬ ЦИТОХРОМ С, ТА ЛІПОСОМАЛЬНА КОМПОЗИЦІЯ, ОТРИМАНА ТАКИМ СПОСОБОМ****(57)** Реферат:

Винахід належить до фармацевтики та стосується способу отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та отриманої цим способом фармакологічно активної ліпосомальної композиції, яка може використовуватись як засіб поліфункціональної фармакотерапії, зокрема, в офтальмології, гематології та кардіології.

Спосіб отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, включає створення суміші розчинів ліпідів в органічних розчинниках, її висушування у вакуумі та емульгування у водному середовищі, що містить цитохром С, додавання кріопротектора, гомогенізацію емульсії, фільтрацію та ліофільне висушування, згідно із винаходом, як ліпіди використовують фосфатидилхолін яєчний або соєвий у суміші із одним або двома іншими ліпідами, вибраними із групи дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, дипальмітоїлфосфатидилхоліну, дистеароїлфосфатидилхоліну, дифосфатидилгліцерину, фосфатидилгліцерину,

UA 118583 C2

фосфатидилінозиту або діолеоїлоксипропілтриметиламонію при масовому співвідношенні фосфатидилхолін:інші ліпіди 0,3-2,0:1, для створення суміші розчинів ліпідів фосфатидилхолін розчиняють в етиловому спирті, а інші ліпіди - у хлороформі при об'ємному співвідношенні в суміші розчинів етиловий спирт:хлороформ 1:1,5-2,5, емульгування проводять при масовому співвідношенні цитохром С:ліпіди 1:11,4-18,5, додаючи до водного середовища розчин кріопротектора, вибраного з ряду олігоцукрів лактози, трегалози, цукрози, що містить (60-80) % від загальної кількості кріопротектора, гомогенізацію проводять при поетапному зростанні тиску від 300 до 800 атм, після її завершення до емульсії вводять розчин вибраного кріопротектора, що містить (40-20) % від загальної його кількості, а масове співвідношення суміш ліпідів:кріопротектор становить 1:5,5-7,2.

Також заявлена ліпосомальна композиція, що містить цитохром С, ліпіди і кріопротектор, виконана відповідно до описаного вище способу, в якій присутні фосфатидилхолін яечний або соевий у суміші із одним або двома іншими ліпідами, вибраними із групи дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, дистеароїлфосфатидилхоліну, дифосфатидилгліцерину, фосфатидилгліцерину, фосфатидилінозиту або діолеоїлоксипропілтриметиламонію та кріопротектор, вибраний із ряду олігоцукрів лактози, трегалози, цукрози, причому у складі композиції масове співвідношення цитохром С:фосфатидилхолін:інші ліпіди:кріопротектор становить 1:2,9-8,6:4,3-15,7:78,6-102,8, а відсоткове співвідношення їх вмісту - (0,81-1,06)%:(3,03-8,26)%:(4,13-9,88)%:(78,67-83,30) %, відповідно.

Винахід належить до фармацевтики та стосується способу отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та отриманої цим способом фармакологічно активної ліпосомальної композиції, яка може використовуватись як засіб поліфункціональної фармакотерапії, зокрема, в офтальмології, гематології та кардіології.

Цитохром С є невеликим білком (м.м. 12 кДа), що присутній практично в усіх аеробних організмах та бере участь в окисно-відновних процесах тканинного дихання, виконуючи ферментну функцію у дихальному ланцюгу мітохондрій. Простетична група ферменту містить залізо, що оборотно переходить із окисленої форми у відновлену. Цитохром С здатний прискорювати обмінні процеси в тканинах, покращувати утилізацію кисню та зменшувати наслідки патологічних гіпоксичних та токсикологічних впливів [1].

Зазначені фактори, що обумовлюють багатовекторні фізіологічні властивості цитохрому С, стали підґрунтям його фармакотерапевтичного застосування. Відома низка препаратів на основі активної субстанції цитохрому С різних виробників у парентеральній та крапельній (очні краплі) лікарських формах: «Цитохром С», «Фармстандарт-Біолік», Україна; «Цитохром С», «Самсон-мед», РФ; «ЦитоМак», «Heinrich Mark», Німеччина; «Цитохром С», «Defeier Pharm.», Китай; «Офтан-Катахром», «Santen Oy», Фінляндія; «Вітафакол», «Ciba Vision Ophthalmics», Франція тощо [2]. На тлі універсальності окисно-відновних властивостей ферменту, дія цих препаратів спрямована на відновлення рівня ендogenous цитохрому С, що знижується у таргетних органах внаслідок ураження (зокрема, у кришталику при катаракті) [3].

Однак клінічне використання цитохрому С супроводжується низкою побічних ефектів, серед яких найвираженими є алергічні реакції, гіпотонія і запаморочення (розчин для ін'єкцій) та печія ока і контактний дерматит (очні краплі). Прояви цих небажаних реакцій значно посилюються через передбачене інструкціями із клінічного застосування всіх відомих лікарських засобів цитохрому С дуже тривале курсове використання: до 25 діб для ін'єкційних форм та аж до 6 місяців для очних крапель, що пов'язано із особливостями біодоступності водорозчинної субстанції цитохрому С (зокрема – із малоефективним її проникненням до відділів ока) та досить швидким її виведенням з організму [2,4].

Доцільність розширення фармакотерапевтичного використання цінних властивостей цитохрому С за умови одночасної оптимізації співвідношення користь/ризик та підвищення таргетності актуалізує задачу створення його засобів у нових лікарських формах і розробки способів отримання таких засобів.

Сучасним вимогам до таких способів і продуктів повною мірою відповідає отримання лікарських препаратів на ліпосомальній платформі, що пов'язано з апіорними фізіологічними перевагами ліпосом [5]: природна біосумісність ліпідного матрикса цих наночасток із організмом; програмованість транспорту; вибірковість депонування щодо тканин, що перебувають у стані гіпоксії; неантигенність та відсутність системної токсичності чи значущих побічних ефектів.

Ліпосомальна організація активних фармацевтичних субстанцій різних класів [5,6] є інноваційним напрямком сучасної фармації, що відображено у нормативних документах світових регулюючих органів (FDA, 2014: Recent requirements for innovated liposomal drugs and liposomal nanosimilars; EMA, 2015: Guidelines and regulatory aspects of liposomal drugs; Державна фармакопея України, 2015: Ліпосомальні лікарські засоби N:).

Сьогодні у світі за різними клінічними показами ліцензовано більше 60 ліпосомальних препаратів (Доксил, Ліподокс, Дауноксет, Депоцит, Міоцет – онкологія, Амбісом – протигрибкова терапія, Ліолів – гастроентерологія, Ліпін – пульмонологія, нефрологія та акушерство, Ліпофлавіон – кардіологія, онкологія; Візудін, Ліпофлавіон, Ліпоферон - офтальмологія тощо).

Ефективність застосування ліпосомальних засобів в різних сегментах клініки дозволила прогнозувати позитивні наслідки розробки способу включення до ліпосом субстанції цитохрому С з метою отримання продукту, що сполучає поліфункціональність фармакотерапевтичного впливу із нешкідливістю.

Опубліковані результати наукових досліджень ліпосомальних систем із цитохромом С [7-9]. Основною метою зазначених наукових публікацій було визначення варіабельності ліпідного складу ліпосом та параметрів не валідованих експериментальних методів їх створення (наприклад, тонкошарового випарювання, силового протискування крізь скляні пори різної щільності тощо), а також оцінка їх потенційної фармакологічної дії. У цих дослідженнях розміри отриманих ліпідних везикул коливаються від 100 нм до 10000 нм, а інкапсулювання субстанції цитохрому С не перевищує 50-60 %.

Описані способи отримання ліпосомальних композицій цитохрому С на основі природних ліпідів [10-13].

Згідно з [10], одержання ліпосомальної форми цитохрому С виконують шляхом одержання плівки суміші негативно заряджених ліпідів з їх органічного розчину з наступним суспендуванням у водному розчині цитохрому С у фізіологічному розчині та продавленням суспензії на екструдері. Оскільки співвідношення ліпідів у суміші не ідентифіковане, а для встановлення утворення ліпосом, їх розмірів та вмісту цитохрому С застосовано виключно оціночні виміри спектра поглинання в діапазоні від 400 до 700 нм (т.з. «спектр каламутності»), ліпосомальну природу, розмір часток та сам факт включення цитохрому С до цільового продукту не можна вважати підтвердженими і достовірними.

Відомий з [11] спосіб передбачає розчинення у хлороформі соєвого фосфатиділхоліну, комплексу аніонних фосфоліпідів сої, холестерину та вітаміну Е при масовому співвідношенні 55:25:10:1, відповідно, змішування цих розчинів із наступним висушуванням та емульгуванням у водному розчині цитохрому С, диспергування емульсії УЗ-впливом та стерилізуючу фільтрацію. Співвідношення суми ліпідів до цитохрому С в продукті становить 8:1. Цей спосіб забезпечує включення до ліпосом лише 55-60 % введеного цитохрому С (тобто у складі отриманої композиції знаходиться майже половина «вільної» форми субстанції). Крім цього, суттєвим недоліком цього способу є використання ультразвукового методу диспергування емульсії, що негативно впливає на якість ліпосомального продукту, який має високий ступінь окисленості (перекисне число 0.1-0.2), та апіорно унеможлиблює отримання стандартизованої композиції в промислових умовах.

Відомий спосіб отримання ліпосомальної композиції цитохрому С з природними фосфоліпідами і добавками холестерину, ситостеролу, поліетиленгліколю-4000, та аскорбінової кислоти [12] включає висушування суміші фосфоліпідів і холестерину з наступним емульгуванням отриманої плівки у розчині цитохрому С та інших водорозчинних компонентів у фосфатному буфері та диспергуванням і стерилізуючою фільтрацією отриманої ліпосомальної емульсії. Цьому способу та продукту його реалізації, тим не менш, притаманні суттєві недоліки: присутність невиправдано великої кількості холестерину (20-40 мас. %), що підвищує жорсткість мембрани ліпосом і тривалість етапу стерилізуючої фільтрації; неоднорідність розмірів ліпосом в діапазоні від 50 нм до 120 нм; відсутність підтвердження самого факту інкапсуляції цитохрому С до ліпосом, тобто не стандартизованість отриманої ліпосомальної композиції.

Відомий спосіб отримання ліпосомальної форми цитохрому С [13], що містить цитохром С та суміш двох ліпідів – дипальмітоїлфосфатидилгліцерину та фосфатидилхоліну. Зазначений спосіб та продукт його реалізації вибрано за прототип заявлюваного об'єкта – способу отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальної композиції, що отримана таким способом, - як його близький аналог за узагальненими ознаками, а саме: суттю і послідовністю основних операцій здійснення способу, ліпосомальною організацією створеної композиції, що містить цитохром С, та природою деяких компонентів в її складі.

Зазначений спосіб отримання ліпосомальної форми цитохрому С [13] передбачає висушування у вакуумі суміші дипальмітоїлфосфатидилгліцерину та фосфатидилхоліну із масовим співвідношенням 1:1,2-4,0 із розчину в суміші хлороформу та етилового спирту, її емульгування у водному середовищі, що містить цитохром С, при масовому співвідношенні цитохром С:суміш ліпідів 1:29,33-66,66, гомогенізацію емульсії під тиском 600-1200 атм, у процесі якої додається кріопротектор лактоза при масовому співвідношенні суміші ліпідів та лактози 1:3,0-5,5 та стерилізуючу фільтрацію з наступним ліофільним висушуванням.

Однак спосіб за прототипом передбачає проведення операцій за певних умов, які можуть негативно впливати на відтворення самого способу та якість цільового продукту, а створена ліпосомальна композиція не забезпечує оптимального прогнозованого фармако-терапевтичного ефекту.

По-перше, при реалізації прототипу розчинення обох ліпідів – фосфатидилхоліну та дипальмітоїлфосфатидилгліцерину - проводять у суміші хлороформу та спирту етилового (із співвідношенням 4:1), що пролонгує час розчинення, а тому може сприяти окисленню субстанцій.

По-друге, прототипом передбачено одномоментне введення всієї використаної кількості кріопротектора лактози під час операції диспергування емульсії, а також проведення всього процесу диспергування при фіксованому тиску. Сумарно, ці фактори призводять до подовження тривалості процесу, а надалі можуть негативно вплинути на операцію ліофілізації та однорідність розмірів ліпосом. Останній фактор є особливо важливим з огляду на деклароване прототипом офтальмологічне призначення цільового продукту. Так, згідно з прототипом, отримана ліпосомальна композиція цитохрому С містить до 10 % т.з. «малих» ліпосом розміром до 75 нм, що прогнозно погіршує фармакологічний ефект при застосуванні продукту у формі очних крапель [6].

По-третє, для здійснення способу-прототипу пропонується масове співвідношення цитохром С:суміш ліпідів 1:29,33-66,66, тобто активна субстанція суттєво поступається внеском ліпідному компоненту – матриці ліпосом. При цьому в суміші ліпідів, яка, незважаючи на узагальнену дефініцію, представлена лише двома конкретним ліпідами, нейтральний фосфатидилхолін значно переважає за вмістом аніонний ліпід дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (до 4-х разів). Зважаючи на те, що заряд ліпиду впливає на фармакологічну активність ліпосомального продукту (негативний заряд може пролонгувати час його утримання в органі-мішені), зазначені фактори не дозволяють визнати застосовані прототипом співвідношення компонентів оптимальними для створення композиції із бажаною ефективністю.

Слід звернути увагу, що в редакції формули винаходу за прототипом певні положення не погоджуються із відповідними твердженнями описів прикладів, які пояснюють цю формулу (приклади № 1-4). Так, співвідношення цитохром С:ліпіди, що за формулою повинно становити 1:29,33-66,66, згідно з прикладами фактично складає 1:16,3-37,0. Формула прототипу передбачає зміни тиску, за якого проводять гомогенізацію емульсії, в діапазоні 600-1200 атм, хоча в усіх прикладах цей процес проведено лише за фіксованого тиску 900 атм. Наведене у формулі протитипу твердження про створення «ліпосомального препарату для офтальмології» є декларативним, оскільки не підтверджено жодним доказом на користь фармакологічної активності, створеної композиції, у т.ч. щодо його прогнозованої офтальмологічної специфіки.

Зазначені обставини знижують ефективність і достовірність способу-прототипу щодо процесу його реалізації, а також якості та стабільності цільового продукту як фармакологічно активної ліпосомальної форми цитохрому С.

Задачею винаходу, що заявляється, є створення способу отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, з оптимізованими параметрами операцій, який забезпечує підвищення якості та стабільності цільового продукту, та одержання за цим способом ліпосомальної композиції цитохрому С з оптимальним складом та фармакологічними властивостями, що адекватна застосуванню як засіб поліфункціональної фармакотерапії.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, який включає створення суміші розчинів ліпідів в органічних розчинниках, її висушування у вакуумі та емульгування у водному середовищі, що містить цитохром С, додавання кріопротектора, гомогенізацію емульсії, фільтрацію та ліофільне висушування, згідно із винаходом, як ліпіди використовують фосфатидилхолін яєчний або соєвий у суміші із одним або двома іншими ліпідами, вибраними із групи дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, дипальмітоїлфосфатидилхоліну, дистеароїлфосфатидилхоліну, дифосфатидилгліцерину, фосфатидилгліцерину, фосфатидилінозиту або діолеоїлоксипропілтриметиламонію при масовому співвідношенні фосфатидилхолін:інші ліпіди 0,3-2,0:1, для створення суміші розчинів ліпідів фосфатидилхолін розчиняють в етиловому спирті, а інші ліпіди - у хлороформі при об'ємному співвідношенні в суміші розчинів етиловий спирт:хлороформ 1:1,5-2,5, емульгування проводять при масовому співвідношенні цитохром С:ліпіди 1:11,4-18,5, додаючи до водного середовища розчин кріопротектора, вибраного з ряду олігоцукрів лактози, трегалози, цукрози, що містить (60-80) % від загальної кількості кріопротектора, гомогенізацію проводять при поетапному зростанні тиску від 300 до 800 атм, після її завершення до емульсії вводять розчин вибраного кріопротектора, що містить (40-20) % від загальної його кількості, а масове співвідношення суміш ліпідів:кріопротектор становить 1:5,5-7,2.

Поставлена задача вирішується також тим, що внаслідок реалізації описаного нового способу створюється ідентифікована ліпосомальна композиція, що містить цитохром С, ліпіди і кріопротектор, в якій, згідно із винаходом, присутні фосфатидилхолін яєчний або соєвий у суміші із одним або двома іншими ліпідами, вибраними із групи дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, дипальмітоїлфосфатидилхоліну, дистеароїлфосфатидилхоліну, дифосфатидилгліцерину, фосфатидилгліцерину, фосфатидилінозиту або діолеоїлоксипропілтриметиламонію та кріопротектор, вибраний із ряду олігоцукрів лактози, трегалози, цукрози, причому у складі композиції масове співвідношення цитохром С:фосфатидилхолін:інші ліпіди:кріопротектор становить 1:2,9-8,6:4,3-15,7:78,6-102,8, а відсоткове співвідношення їх вмісту - (0,81-1,06):(3,03-8,26):(4,13-9,88):(78,67-83,30) %, відповідно.

Згідно із задачею винаходу, для створеної композиції встановлено різновекторну фармакологічну активність: в офтальмології (антикатарактальний ефект), гематології (відновлення системи згортання крові при гострій масивній крововтраті) та кардіології (антигіпоксичний ефект), а також антитоксична дія.

Наступними прикладами проілюстровано можливість здійснення заявлюваного способу та отримання за цим способом цільового продукту-композиції, а для порівняння – прикладу за способом-прототипом.

Для зручності наведено умовні позначення назв ліпідів, що далі використані в описах способу та композиції, що заявляються, та у прототипі.

Раціональна назва ліпиду	Умове позначення
Фосфатидилхолін	ФХ
Фосфатидилхолін яєчний	ФХ(я)
Фосфатидилхолін соєвий	ФХ(с)
Дипальмітоїлфосфатидилгліцерин	ДПФГ
Дипальмітоїлфосфатидилхолін	ДПФХ
Дистеароїлфосфатидилхолін	ДСФХ
Дифосфатидилгліцерин	ДФГ
Фосфатидилгліцерин	ФГ
Фосфатидилінозит	ФІ
Діолеоїлоксипропілтриметиламоній	ДОТА

Приклад 1 – Заявлений об'єкт. Точну наважку 6,0 г ФХ(я) (у перерахунку на 100 % речовину [наприклад, 14]) розчиняють у 100 мл спирту етилового при перемішуванні. Точну наважку 5,0 г ДПФГ (у перерахунку на 100 % речовину [14]) при перемішуванні розчиняють у 150 мл хлороформу та об'єднують отриманий розчин із спиртовим розчином ФХ(я) (співвідношення спирт етиловий:хлороформ 1:1,5 об.). Суміш розчинів ліпідів фільтрують крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм, переносять до ротаційного випаровувача та видаляють розчинники висушуванням у вакуумі при температурі 40-45 °С до отримання тонкої плівки. По закінченні процесу висушування у колбу випаровувача протягом 25-45 хв пропускають інертний газ. Точну наважку 0,70 г цитохрому С (у перерахунку на 100 % речовину [наприклад, 15-16]) розчиняють у 80 мл стерильного фосфатного буферного розчину рН (6,7-7,1) та фільтрують крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм. Точну наважку 60,0 г лактози (молочний цукор фармакопейний) у перерахунку на 100 % речовину при температурі 50-60 °С та перемішуванні розчиняють у 250 мл стерильного фосфатного буферного розчину рН (6,7-7,1) і фільтрують крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм.

Отриману після висушування плівку ліпідів кількісно знімають зі стінок колби випаровувача за допомогою суміші 620 мл стерильного фосфатного буферного розчину рН (6,7-7,1), 80 мл розчину цитохрому, що містить 0,7 г цитохрому С, і 240 мл розчину лактози у фосфатному буфері, що містить 48,0 г лактози, при перемішуванні протягом 60 хв при 100-120 об./хв. (наприклад, ІКА, Німеччина) до отримання однорідної емульсії.

Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску (наприклад, М 110Р Microfluidizer Processor, Microfluidics) і піддають диспергуванню при температурі 38-45 °С з поетапним підвищенням тиску від 300 атм до 800 атм протягом 1-3 циклів. Розмір часток емульсії (наприклад, Malvern Zetasizer Nano S) наприкінці процесу диспергування не перевищує 160 нм.

Після закінчення гомогенізації до емульсії додають 60 мл стерильного розчину лактози в буферному розчині рН (6,7-7,1), що містить 12,0 г лактози, та перемішують. Об'єм емульсії становить 1000 мл. Отриману емульсію фільтрують крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм, а далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах у скляні флакони.

Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню та проводять ліофільне висушування (наприклад, Martin Christ-2-6-D, США). Після висушування флакони із ліофілізованим продуктом герметизують в атмосфері інертного газу в асептичних умовах.

У прикладах 2-12 етапи способу, що заявляється, здійснюють відповідно до прикладу 1. Зміни параметрів реалізації процесу відображено в таблицях № 1-3.

Цільовий продукт є легкою аморфною масою жовтуватого кольору із характерним запахом.

Приклад 13 - Прототип згідно з [13]. ФХ у кількості 3,6 г та ДПФГ у кількості 1,0 г (у перерахунку на 100 % речовину) розчиняють у 150 мл суміші хлороформу та спирту етилового (співвідношення 4:1) і перемішують. Розчин ліпідів фільтрують крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм, переносять до ротаційного випаровувача та випаровують при температурі (41-45) °С до отримання тонкої плівки. Плівку обробляють газом азотом протягом 15-20 хв. Точну наважку 0,135 г цитохрому С (у перерахунку на 100 % речовину) розчиняють у 135 мл стерильного фосфатного буферного розчину рН 6,5-6,8 (концентрація 1 мг/мл цитохрому С) та фільтрують

цей розчин крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм. Точну наважку 14,0 г лактози у перерахунку на 100 % речовину розчиняють у 35 мл стерильного фосфатного буферного розчину рН 6,5-6,8 (концентрація 400 мг/мл лактози) та фільтрують крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм.

5 Отриману після висушування плівку ліпідів кількісно знімають зі стінок колби випаровувача сумішшю 135 мл розчину цитохрому С (з концентрацією 1 мг/мл) та 30 мл стерильного фосфатного буферного розчину рН (6,5-6,8). Вміст колби перемішують протягом 2 годин до отримання однорідної емульсії.

10 Емульсію переносять у гомогенізатор високого тиску і піддають диспергуванню при температурі 38-44 °С під тиском 900 атм до отримання розміру часток, що не перевищує 200 нм. За досягнення зазначеного розміру часток до емульсії додають 35 мл розчину лактози (містить 14 г лактози). Диспергування продовжують до отримання часток розміром, що не перевищує 130-150 нм.

15 Отриману емульсію фільтрують крізь каскад фільтрів із фінішним фільтром із розміром пор 0,22 мкм, а далі піддають стерилізуючій фільтрації, розливають у скляні флакони, ліофілізують і герметизують в атмосфері азоту.

За результатами відтворення способу-прототипу отримують продукт у вигляді легкої аморфної маси жовтуватого кольору із характерним запахом.

20 При ідентифікації та встановленні параметрів якості ліпосомальних композицій, що отримані за запропонованим способом і способом-прототипом, їх використовували per se та у формі емульсії, відтвореної шляхом додавання у флакони з ліофілізованим продуктом стерильного ізотонічного фізіологічного розчину, що відповідає формі їх потенційного фармакотерапевтичного застосування.

25 Ефективність заявляюаного способу за фармацевтичною якістю створеної ліпосомальної композиції підтверджена результатами якісної та кількісної ідентифікації цитохрому С і ліпідних компонентів (ФХ та інших ліпідів) та ліпосомального статусу цільового продукту із застосуванням низки незалежних фізико-хімічних методів, а саме:

30 - спектрофотометричним методом за характеристичним спектром поглинання у діапазоні 400-600 нм та показниками оптичної густини при довжинах хвиль (407±2) нм і (490±2) нм розчину, що отриманий після витримування цільового продукту у воді при температурі 35 °С протягом 30 хв, у порівнянні із таким розчину стандартного зразка цитохрому С (ідентифікація та кількісне визначення цитохрому С, відповідно);

35 - методом електрофорезу з натрію додецилсульфатом у поліакриламідному гелі (ДСН-ПААГ) за електрофореграмою водного розчину цільового продукту у порівнянні із таким розчином стандартного зразка цитохрому С (ідентифікація цитохрому С, відповідно);

40 - спектрофотометричним методом за характеристичним спектром поглинання у діапазоні 450-650 нм із максимумами при довжинах хвиль (522-526) нм і (559-561) нм розчину, що отриманий після витримування цільового продукту у воді при температурі 35 °С протягом 30 хв, із наступним пропусканням оксиду азоту (П) до появи яскраво-рожевого забарвлення (ідентифікація залізовміщуючої простетичної групи цитохрому С);

45 - методом тонкошарової хроматографії за хроматограмою розчину цільового продукту в суміші хлороформу, метанолу і води (73:23:3 об.), на якій присутні плями ФХ та інших ліпідів на рівні основних плям на хроматограмах розчинів стандартних зразків ФХ та інших відповідних ліпідів (ідентифікація ФХ та інших ліпідів);

50 - методом рідинної хроматографії з детектуванням випарювальним розсіюванням світла (ELSD) за хроматограмою розчину цільового продукту в суміші хлороформу, метанолу і води (73:23:3 об.), використовуючи для калібрування та порівняння розчини стандартних зразків ФХ та відповідних ліпідів (кількісне визначення ФХ та інших ліпідів);

55 - методом рідинної хроматографії із спектрофотометричним детектуванням при довжині хвилі 409 нм за хроматограмою розчину, що отриманий після витримування цільового продукту у воді при кімнатній температурі протягом 30 хв, у порівнянні із розчином стандартного зразка «вільного» цитохрому С (ступінь інкапсулювання цитохрому С до ліпосом);

60 - за виміром розміру часток в емульсії ліпосомального продукту методом динамічного розсіювання світла (DLS);

- за показником індексу окислення ліпідної фракції цільового продукту (стабільність ліпосом);

- за параметрами часу утворення, стійкості до розшарування та

дисперсного складу емульсії, відтвореної із ліофілізованого цільового продукту (функціональна стабільність та розподілення ліпосом за розмірами);

- за показниками рН та осмоляльності емульсії (визначення відповідності вимогам функціонального застосування парентеральних та офтальмологічних препаратів).

Згідно із результатами фізико-хімічних аналізів (Таблиця 4), спосіб, що заявляється, забезпечує фармацевтичну якість та стабільність цільового продукту як ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, а саме:

- за даними методів спектрофотометрії, тонкошарової хроматографії та рідинної хроматографії у цільовому продукті зберігаються нативний склад та природа цитохрому С, ФХ та інших вибраних ліпідів, що збігаються із такими стандартами цитохрому С, ФХ та відповідних ліпідів;
- цитохром С кількісно включається до ліпосом із ступенем інкапсулювання більше 90 %;
- для цільового продукту характерно швидке утворення емульсії з ліофілізату та її висока стійкість до розшарування;
- в емульсії цільового продукту сталий середній розмір 147 ± 3 нм ліпосом супроводжується практичною монодисперсністю їх розподілення за розміром (90-100 %), у т.ч. після тривалого зберігання, та низьким індексом окислювання;
- значення рН емульсії є стабільним та відповідає фізіологічним нормам для цього показника in vivo;
- показник осмоляльності відповідає фармакопейним вимогам для офтальмологічних препаратів.

Зазначимо, що оптимальна фармацевтична якість і стабільність притаманні цільовому продукту, створеному за прикладами 1-8, а реалізація заявлюваного способу при відмінних параметрах (приклади 9-12) та за способом-прототипом (приклад 13) обумовлює негативне викривлення цих показників (таблиця 4), а саме:

- зменшення ступеня інкапсулювання цитохрому С до ліпосом (на 2,8-7,0 % у прикладах 9-12 та на 6,8-11,0 % у прототипі);
 - значну неоднорідність дисперсності ліпосом за розмірами (60-25-15 %, 80-10-10 % та 75-25 % у прикладах 9,11 та 12, відповідно та 67-33 % у прототипі), яка посилюється протягом зберігання продукту, з тенденцією до зростання розміру ліпосом;
 - відносне підвищення індексу окислювання ліпосомального продукту;
 - збільшення часу утворення емульсії із ліофілізованого продукту (у 1,5-2 рази) одночасно із зменшенням її стійкості до розшарування (в 1,3 рази);
 - відносне зростання осмоляльності емульсії (на 10-40 мосмоль/г аж до досягнення верхньої границі фармакопейної норми 380 мосмоль/г для офтальмологічних препаратів).
- Вказані важливі переваги фармацевтичної якості та стабільності композиції, створеної за прикладами 1-8, є наслідком і сполучаються із оптимізованими показниками здійснення заявлюваного способу (Таблиця 3), порівняно із параметрами процесу, що передбачені прикладами 9-12 та способом-прототипом (приклад 13), зокрема:
- нарізне розчинення у різних розчинниках - ФХ (в етанолі) та інших ліпідів (у хлороформі) з наступним їх об'єднанням за кінцевого співвідношення етиловий спирт:хлороформ 1:1,5-2,5 (порівн.: використання за аналогією з прототипом для розчинення суміші етанол:хлороформ 1:4 у прикладах 9 і 12 призвело до погіршення фармацевтичної якості продукту);
 - скорочення у 1,5-2,6 разу часу перемішування після емульгування;
 - диспергування протягом трьох послідовних циклів при тиску в межах 300-800 ат;
 - двоетапне введення кріопротектора: при емульгуванні (60-80 %) та після диспергування (40-20 %) (порівн.: введення всієї кількості або частини кріопротектора у процесі диспергування у прикладах 9 та 11 та прототипі призвело до погіршення фармацевтичної якості продукту);
 - відсутність операції фільтрації на каскаді фільтрів, завдяки чому у 2,1-2,9 рази скорочено загальний час фільтрації.

Таким чином, заявлюваний спосіб, реалізований за прикладами 1-8, забезпечує створення ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, із конкурентноспроможною високою фармацевтичною якістю та стабільністю, одночасно із певними технологічними перевагами здійснення цього способу. Важливо, що цей висновок справджується при застосуванні цілого спектра вибраних для реалізації способу ліпідів і кріопротекторів різної природи, зазначених у таблиці 1, що значно розширює межі його застосування.

Всі характеристики фармацевтичної якості продукту реалізації заявлюваного способу встановлені за валідованими методиками. На підставі достовірних даних щодо вмісту у продукті цитохрому С, ФХ та інших ліпідів розраховано склад композиції, отриманої заявлюваним способом і способом-прототипом, за масовим співвідношенням та процентним вмістом компонентів (Таблиця 5). При розрахунку відсоткового складу композиції (на 100 %) взято до уваги експериментально визначений показник втрати маси при висушуванні.

Згідно із задачею винаходу, якість створеної ліпосомальної композиції цитохрому С оцінено за показниками фармакологічної активності у доклінічних дослідженнях при різних патологічних станах та способах введення.

Вибрана специфіка випробувань створеної композиції відповідає задачі винаходу, маючи на увазі доказовість створення цільового продукту із поліфункціональною фармакологічною активністю.

Порівняння специфічної фармакологічної дії ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом та способом-прототипом, проведене в експериментальних моделях наступних патологій:

1) модель світлової катаракти, відтворену хронічним загальним опроміненням тварин (кролі) поліхромним світлом у діапазоні 350-1150 нм протягом 26 тижнів, яка за клінічними ознаками відповідає віковій ядерній катаракті у людини [17].

Досліджувану композицію вводили крапельно у вигляді емульсії (0,675 мг/мл за вмістом цитохрому С). Інстиляції (тричі на день) починали з 21-го тижня після відтворення моделі катаракти та продовжували протягом 6 тижнів.

Як аналог за функціональною активністю при оцінці фармакологічної дії ліпосомальної композиції використано препарат цитохрому С «Офтан-Катахром» («Santen Oy», Фінляндія). Для коректного порівняння дії продуктів для створення емульсії ліпосомальної композиції використано водний розчин, що містить нікотинамід, аденозин і бензалконію хлорид (20, 2 та 0,20 мг/мл, відповідно), аналогічний розчиннику препарату «Офтан-Катахром». Тварини контрольної групи отримували інстиляції цього ж розчинника у відповідних об'ємах.

Оцінку фармакологічної дії ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом та способом-прототипом, у моделі катаракти проводили за стандартами оцінки стану кришталика ока (5 стадій катаракти: від відсутності змін - 0 стадія до інтенсивного катарактального ураження – 5 стадія) [18]. Визначали також біохімічні показники (ферменти та продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ)) у камерній волозі та кришталику.

2) модель ураження гемостатичної системи внаслідок гострої масивної крововтрати (ГМК) в об'ємі 30 % циркулюючої крові тварин (статевозрілі білі щури), яка призводить до дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові із метаболічним ацидозом [19, 20].

Досліджувану композицію вводили через 30 хв після ГМК, внутрішньовенно, у вигляді емульсії у фізіологічному розчині (1 мг/кг за вмістом цитохрому С) в об'ємі, що відповідає об'єму втраченої крові (ізовол'юмічне поповнення).

Оцінку фармакологічної дії ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом та способом-прототипом, у моделі ГМК проводили за показниками системи згортання, кислотно-лужного стану і газообміну артеріальної крові тварин.

3) моделі нормобаричної, гемічної та гістотоксичної (тканинної) гіпоксії, що використовуються для оцінки антигіпоксичної дії потенційних лікарських засобів [21].

Нормобаричну гіпоксію відтворювали, вміщуючи експериментальних тварин у гермокамеру із замкненим об'ємом життєвого простору 0.5 л. Гемічну гіпоксію викликали введенням тваринам метгемоглобінутворюючої речовини - нітриту натрію у дозі 200 мг/кг. Тканинну гіпоксію моделювали шляхом введення нітропрусида натрію за наступною схемою: 1-4 доба – 1 мг/кг (раз на добу), 5-а доба – 25 мг/кг. У всіх моделях гіпоксії в експериментах використано дорослих білих мишей обох статей.

Досліджувані продукти вводили у вигляді внутрішньоочеревинних ін'єкцій у дозі 2 мг/кг (за вмістом цитохрому С) за наступною схемою: 1-4 доба, раз на добу, 5-а доба – за 30 хв до моделювання гіпоксії.

Критерієм оцінки антигіпоксичної дії ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом та способом-прототипом, була тривалість життя експериментальних тварин.

4) модель наркотичної інтоксикації [21], викликану введенням дорослим білим щурам обох статей тіопенталу натрію в дозі 45 мг/кг.

Досліджувані продукти вводили у вигляді внутрішньоочеревинних ін'єкцій за 30 хв перед введенням ксенобіотику в дозі 1 мг/кг (за вмістом цитохрому С).

Критерієм оцінки антитоксичної дії ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом та способом-прототипом, була тривалість наркотичного сну.

Для коректної оцінки фармакологічної дії у моделях ГМК, гіпоксії та наркотичної інтоксикації як аналог ліпосомальної композиції за функціональною активністю використано розчин цитохрому С у фізіологічному розчині (наприклад, Farmasino Pharm. Co., Ltd, Китай) в

еквімолярних кількостях за вмістом цитохрому С. Тварини контрольних груп отримували ін'єкції фізіологічного розчину у відповідних об'ємах.

Відповідно до чинних вимог до фармакологічних продуктів, які розглядаються як потенційні лікарські препарати, а також з метою підтвердження коректності дозового режиму та способу застосування, оцінено нешкідливість ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом та способом-прототипом, при передбачених способах її введення (ін'єкції та очні краплі).

Застосовані продукти у вигляді емульсії у фізіологічному розчині при одноразовому внутрішньовенному введенні та за повторних внутрішньоочеревинних ін'єкцій (14 діб) не викликали загибелі експериментальних тварин (білі щури), не справляли місцевоподразнювальної дії, негативного впливу на масу тіла та масові коефіцієнти внутрішніх органів, не обумовили змін формули крові та основних біохімічних показників сироватки крові.

При вивченні гострої та хронічної (28 діб) офтальмотоксичності ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, у формі крапель у фізіологічному розчині не встановлено будь-яких негативних проявів щодо структури переднього відділу ока і диска зорового нерва, а також місцевоподразнювальної та алергізуючої дії (на кролях).

Таким чином, за показниками гострої та хронічної токсичності, у т.ч. офтальмонешкідливості, що не відрізняються для ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом та способом-прототипом, їх слід віднести до практично нешкідливих засобів, що обумовлює можливість потенційного фармакотерапевтичного використання.

З метою дотримання біоетичних норм, що регламентують правила гуманного поводження з тваринами та мінімізацію їх кількості у доклінічних дослідженнях [22], у високоінвазивних експериментальних моделях (гостра масивна крововтрата, катаракта із видаленням кришталика) застосовано окремі показові приклади ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, отриманої за заявлюваним способом. Для оптимального балансу між дотриманням біоетичних норм і достовірністю оцінки фармакологічної активності у моделях різних патологій приклади композиції вибрано за перехресним принципом, причому в моделях гіпоксії (менш інвазивних) досліджено всі приклади композиції із найвищою фармацевтичною якістю (приклад 1-8), а для порівняння - також приклади 9 та 10. Зазначимо, що фармакологічна дія продукту, створеного за способом-прототипом, досліджена в усіх експериментальних моделях (приклад 13).

В таблицях 6-8 наведено результати встановлення фармакологічної дії ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, створеної за заявлюваним способом та способом-прототипом. В усіх моделях патологій продукти виявляють фармакологічну активність, однак саме реалізація заявлюваного способу забезпечує створення композиції із високим поліфункціональним фармакологічним ефектом.

У моделі світлового опромінення без лікування (негативний контроль) у тварин досягаються важкі 3 та 4 стадії катарактального ураження (відповідно, по 50 % очей з катарактою кожної стадії), що супроводжується патологічними змінами біохімічних показників кришталика (накопичення в 1,7 разу продуктів ПОЛ та розбалансування у 1,4-1,7 разу активності ферментів). При цьому заявлювана ліпосомальна композиція цитохрому С виявляє високу антикатарактальну дію (таблиця 6):

- попереджує розвиток катаракти, знижуючи ураження кришталика до початкових стадій 1 та 2 (відповідно, 12,5-25 % очей та 87,5-75 % очей), за відсутності проявів катаракти з важкими необоротними стадіями 3 та 4;

- практично нормалізує показники активності ферментів та вмісту продуктів ПОЛ у кришталику (становлять 89-95 % від норми).

У моделі ГМК ураження системи гемостазу проявляються у зниженні на 15-30 % показників згортання крові та викривленні параметрів кислотно-лужного стану і газообміну крові (зокрема, зниження рН на 0,243 од до не фізіологічних значень та зменшення на 10 % до критичної межі насиченості крові киснем).

Ліпосомальна композиція цитохрому С, створена за заявлюваним способом, має здатність до відновлення основних ланок ураженої внаслідок ГМК системи гемостазу, обумовлюючи (таблиця 7):

- відновлення показників функціонального стану системи згортання крові (до 88-99 % від норми) при виразній тенденції до підтримки коагуляційного гемостазу (тромбоутворення – рівень АПТЧ, ПЧ, ТЧ та фібриноліз – рівень фібриногена);

- практичне усунення декомпенсованого метаболічного ацидозу за показниками кислотно-лужного стану (підвищення рН і ВВ до фізіологічної норми) і газообміну артеріальної крові, у т.ч. нормалізацію важливого показника насиченості крові киснем, O₂Sat (до 99-100 % норми).

У моделях гіпоксії різної етіології (нормобаричній, гемічній, тканинній) заявлювана ліпосомальна композиція цитохрому С забезпечує зростання тривалості життя тварин на 47-68 %, тобто має універсальну антигіпоксичну активність. Композиція справляє антиоксидантний ефект, скорочуючи на 33-40 % тривалість наркотичного сну на тлі наркотичної інтоксикації (таблиця 8).

За рівнем підтвердженої фармакологічної активності при експериментальних патологіях різного генезу ліпосомальна композиція, утворена за заявлюваним способом, є конкурентноздатною як щодо продукту способу-прототипу (ефективність якого в моделях різних патологій менша у 1,2-1,8 разу), так і щодо препаратів-аналогів (ефективність яких в моделях різних патологій менша у 1,3-2,4 разу).

Загалом, найвища якість притаманна ліпосомальній композиції цитохрому С, що створена заявлюваним способом при дотриманні параметрів, які визначені прикладами 1-8, та відмінних від передбачених при створенні композиції за способом-прототипом, а саме: як ліпіди використовують фосфатидилхолін, вибраний серед ФХ(я) або ФХ(с), у суміші з одним або двома іншими ліпідами, вибраними з групи ДПФГ, ДПФХ, ДСФХ, ДФГ, ФГ, ФІ або ДОТА при масовому співвідношенні фосфатидилхолін:інші ліпіди 0,3-2,0:1; розчинення ФХ проводять в етиловому спирті, інших ліпідів - у хлороформі з наступним їх об'єднанням при об'ємному співвідношенні етиловий спирт:хлороформ 1:1,5-2,5; емульгування проводять при масовому співвідношенні цитохром С:ліпіди

1:11,4-18,5, додаючи до середовища розчин кріопротектора, вибраного з ряду олігоцукрів лактози, трегалози, цукрози, що містить (60-80) % від загальної кількості кріопротектора; гомогенізацію проводять при поетапному зростанні тиску від 300 до 800 атм з контролем розміру часток емульсії, а після її завершення до емульсії вводять розчин кріопротектора, що містить (40-20) % від загальної його кількості, при масовому співвідношенні ліпіди:кріопротектор 1:5,5-7,2.

При відхиленні від зазначених вище параметрів (приклади 9-12 та прототип – приклад 13) реалізація способу пролонгується та певним чином ускладнюється (таблиця 3 – збільшення часу перемішування при емульгуванні, каскадна фільтрація та збільшення часу фільтрації після диспергування) і не досягається бажана фармацевтична якість цільового продукту як ліпосомальної композиції цитохрому С (таблиця 4).

Відповідно, висока фармацевтична якість цільового продукту визначає поліфункціональну фармакологічну ефективність і більш високий рівень антикатакральної, антигіпоксичної та антиоксидантної активності і здатності до відновлення гемостатичної системи згортання крові при ГМК у ліпосомальній композиції, що містить цитохром С, суміш ліпідів та кріопротектор, при забезпеченні показників її складу, які визначені прикладами 1-8, та відмінних від таких для композиції, утвореної за способом-прототипом, а саме: суміш ліпідів включає фосфатидилхолін, вибраний серед ФХ(я) або ФХ(с), у суміші з одним або двома іншими ліпідами, вибраними з групи ДПФГ, ДПФХ, ДСФХ, ДФГ, ФГ, ФІ або ДОТА, кріопротектор є олігоцукром, вибраним з ряду лактози, трегалози або цукрози, у складі композиції масове співвідношення цитохром С:фосфатидилхолін:інші ліпіди:кріопротектор становить 1:2,9-8,6:4,3-15,7:78,6-102,8, а відсоткове співвідношення цитохром С:фосфатидилхолін:інші ліпіди:кріопротектор становить (0,81-1,06):(3,03-8,26):(4,13-9,88):(78,67-83,30) %.

Варіювання зазначених показників складу композиції (приклади 9-12 та прототип – приклад 13) знижує рівень її фармакологічних ефектів.

Досягнуте оптимальне сполучення сприятливої технологічності заходів та операцій здійснення способу із достовірною фармацевтичною ідентифікацією та позитивними фармакологічними властивостями цільового продукту доводить переваги заявлюваного способу у вирішенні задачі отримання ліпосомального засобу, що містить цитохром С. Створена за запропонованим способом ліпосомальна композиція цитохрому С з ідентифікованим індивідуальним складом, для якої вперше встановлені поліфункціональні фармакологічні ефекти та нешкідливість, вигідно відрізняється від отриманого за способом-прототипом ліпосомального продукту, що містить цитохром С.

Зазначене обґрунтовує доцільність використання заявлюваного способу для отримання стабільного та якісного ліпосомального засобу, що містить цитохром С, та впровадження створеної цим способом ліпосомальної композиції цитохрому С як потенційного ефективного лікарського препарату із поліфункціональною фармакотерапевтичною дією для застосування в офтальмології, кардіології та гематології.

Таблиця 1

Параметри здійснення заявлюваного способу отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та способу-прототипу за природою ліпідів і кріопротекторів, які використано при реалізації процесу ¹⁾

№ прик- ладу	Використані ліпіди			Кріопро- тектор
	Фосфатидил- холін	Інші ліпіди		
		Назва (позначення)	Масове співвідношення інших ліпідів	
Спосіб, що пропонується				
1	ФХ(я)	ДПФГ	-	Лактоза
2	ФХ(с)	ДПФГ	-	Лактоза
3	ФХ(я)	ДПФГ+ДПФХ	1:1	Трегалоза
4	ФХ(с)	ДСФХ+ДФГ	2,5: 1	Лактоза
5	ФХ(я)	ДПФГ+ФГ	1:1	Трегалоза
6	ФХ(я)	ДПФГ+ФІ	2:	Цукроза
7	ФХ(я)	ДПФГ+ДОТА	2,5:1	Лактоза
8	ФХ(я)	ДПФХ+ДОТА	0,5:1	Трегалоза
9	ФХ(я)	ДПФГ+ДСФХ	0,3:1	Лактоза
10	ФХ(я)	ДПФХ+ДОТА	0,5:1	Трегалоза
11	ФХ(с)	ДСФХ+ДФГ	1:1	Лактоза
12	ФХ(я)	ДПФГ+ФГ	2:1	Лактоза
Спосіб-прототип				
13	ФХ (я) ²⁾	ДПФГ	-	Лактоза

- 1) невід'ємним компонентом реалізації процесу у всіх прикладах є цитохром С.
- 2) походження субстанції у прототипі не ідентифіковане.

Таблиця 2

Параметри здійснення заявлюваного способу отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та способу-прототипу за співвідношеннями компонентів створюваної композиції, які використано при реалізації процесу

№ прикладу	Масове співвідношення		
	Цитохром С : суміш ліпідів *	Інші ліпіди:ФХ	Суміш ліпідів:кріопротектор
Заявлюваний спосіб			
1	1:15,7	1:1,2	1:5,5
2	1:12,9	1: 0,8	1:7,2
3	1:14,3	1:0,7	1:6,5
4	1:18,5	1: 0,9	1:5,6
5	1:15,7	1:0,4	1:6,0
6	1:12,9	1:2,	1:6,7
7	1:17,1	1:0,7	1: 5,8
8	1:11,4	1:0,3	1:6,9
9	1: 12,9	1:0,2	1:4,6
10	1: 21,4	1:4,0	1: 5,3
11	1:12,8	1: 0,15	1: 5,3
12	1: 11,4	1:1,7	1: 4,3
Спосіб-прототип			
13	1:34,1	1:3,6	1:3,0

* суміш ліпідів є сумою ФХ із іншими використаними ліпідами, що зазначені у таблиці 1.

Таблиця 3

Параметри заявлюваного способу отримання ліпосомальної композиції цитохрому С та способу-прототипу за технічними показниками, що використані при здійсненні процесу

	№ прикладу												
	Спосіб, що заявляється												13 -
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Прототип
Середовище розчинення ліпідів:													
а) етиловий спирт-ФХ, хлороформ-інші ліпіди при співвідношенні етиловий спирт: хлороформ 1:1,5-2,5 (об.)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
б) всі ліпіди: суміш етилового спирту з хлороформом (1:4)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Параметри емульгування:													
а) Середовище:													
- суміш розчинів цитохрому С, кріопротектора та буфера;	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
- суміш розчинів цитохрому С та буфера;	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
б) Час перемішування, хв	60	70	55	45	60	45	65	80	112	85	90	95	120
в) Кількість введеного кріопротектора (% від загальної)	80	69	62	65	80	70	60	60	0	40	50	20	0

Продовження Таблиці 3

Параметри заявлюваного способу отримання ліпосомальної композиції цитохрому С та способу-прототипу за технічними показниками, що використані при здійсненні процесу

	№ прикладу												
	Спосіб, що заявляється												13 - Прото- тип
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Параметри диспергування:													
а) Тиск при циклах, атм:													
- 1-й	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	200	300	900
- 2-й	600	600	600	500	600	700	500	600	400	500	600	500	Весь процес
- 3-й	800	800	800	800	800	800	800	800	800	900	800	500	
б) Розмір часток після диспергування, нм	<150	<145	<150	<145	<150	≈ 145	<150	<150	<160	<130	<130	<150	<145
в) Введення розчину кріопротектора:													
- у процесі диспергування	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
- після диспергування	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
г) Кількість введенного кріопротектора (% від загальної)	20	31	38	35	20	40	30	40	100	60	50	80	100
Параметри фільтрації після диспергування:													
а) операція фільтрації:													
- каскад фільтрів	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
- фільтр 0,22 мкм	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
б) середній час фільтрації (на 1 л), хв	10	11	12	10	12	10	14	10	15	20	28	19	29

Таблиця 4

Показники ідентифікації та фармацевтичної якості ліпосомальної композиції, що отримана за заявлюваним способом та способом-прототипом

	№ прикладу												
	Спосіб, що заявляється												13 - Прото- тип
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ідентифікація:													
- цитохром С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- ФХ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- інші ліпіди	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ступінь інкапсулювання цитохрому С до ліпосом (% до уведеної кількості)	95,1	94,1	98,4	95,6	9,8	99,0	9,0	94,8	89,0	91,3	90,3	92,0	88,0
Розмір ліпосом (нм)/ % ліпосом за розміром: *													
а) після ліофілізації	147/95 132/5	150/90 138/10	145/ 100	145/95 135/5	147/97 140/3	147/92 135/8	145/94 130/6	150/90 140/10	165/60 130/25 100/15	150/90 132/10	148/80 125/10 100/10	165/75 150/25	155/67 62/33

б) після 9 місяців зберігання	150/95 135/5	150/90 138/10	148/ 100	148/95 135/5	150/95 140/5	150/92 140/9	145/95 135/5	152/90 142/10	160/55 130/25 95/10 65/5	145/90 130/10	150/75 130/15 100/10	160/80 140/20	155/60 60/25 52/15
Індекс окислювання, ум.од	0,24	0,28	0,22	0,20	0,24	0,25	0,26	0,22					
Час утворення/ стійкість емульсії (хв) *	1,2/ 115	1,5/ 110	1,5/ 120	1,0/ 110	1,2/ 112	1,2/ 120	1,0/ 100	1,0/ 105	2,0/80	1,0/ 90	1,8/ 100	2,0/ 95	1,8/ 95 ***
pH емульсії *	6,56	6,50	6,56	6,70	6,55	6,61	6,50	6,50	6,62	6,48	6,75	6,58	6,74 ***

* - визначено для емульсії, що відтворена при додаванні 10 мл фізіологічного розчину до ліофілізованого продукту – ліпосомальної композиції

** - згідно з вимогами Державної фармакопеї України (2.2.35), для офтальмологічних лікарських засобів показник осмоляльності має бути в межах 300-380 мосмоль/г

*** - прототипом не регламентується

Продовження Таблиці 4

Показники ідентифікації та фармацевтичної якості ліпосомальної композиції, що отримана за заявлюваним способом та способом-прототипом

	№ прикладу												
	Спосіб та композиція, що заявляються												13 - Прото- тип
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Осмоляльність емульсії, мосмоль/г ***)***	320	330	310	330	320	340	350	330	380	340	360	330	380
Втрата маси при висушуванні (%) ***	5	5	5	5	4	4	5	4	6	5	5	3	6
Кількісний вміст (мг/мл) * :													
- цитохром С	0,70	0,70	0,70	0,0	0,70	0,70	0,70	0,70	0,67	0,70	0,70	0,70	0,67
- ФХ	6,0	4,0	4,0	7,0	3,0	6,0	2,0	5,0	9,0	3,0	8,0	5,0	18,0
- інші ліпіди	5,0	5,0	6,0		8,0	3,0	6,0	7,0	2,0	12,0	1,0	3,0	5,0

(+) – ідентифікація позитивна

* - визначено для емульсії, що відтворена при додаванні 10 мл фізіологічного розчину до ліофілізованого продукту – ліпосомальної композиції

** - згідно з вимогами Державної фармакопеї України (2.2.35), для офтальмологічних лікарських засобів показник осмоляльності має бути в межах 300-380 мосмоль/г

*** - прототипом не регламентується

Таблиця 5

Склад ліпосомальної композиції цитохрому С,
отриманої заявлюваним способом і способом-прототипом, за масовим та процентним
співвідношенням компонентів, вміст яких визначено за встановленими показниками
фармацевтичної якості

№ прик- ладу	Масове співвідношення цитохром С:ФХ:інші ліпіди : : кріопротектор *	Вміст (мас. %)			
		Цито- хром С	ФХ	Інші ліпіди	Кріопротектор
Композиція, отримана за заявлюваним способом					
1	1:8,6:7,1:85,7	0,93	7,95	6,63	79,50
2	1: 5,7:7,1:9,9	0,89	5,09	6,36	82,66
3	1: 5,7: 8,6:92,9	0,88	5,02	7,53	81,57
4	1:8,6:10,0:102,8	0,84	7,15	8,34	78,67
5	1:43:15,7:94,3	0,86	3,71	9,88	81,54
6	1: 8,6:4,3:85,7	0,96	8,26	4,13	82,64
7	1:7Ю,1:7,1 100,0	0,81	5,80	8,13	81,95
8	1: 2,9:8,6:78,6	1,06	3,03	9,09	83,30
9	1:12,8: 2,9:71,4	1,09	14,02	3,11	77,88
10	1:4,3:17,1: 114,3	0,70	3,00	12,0	80,0
11	1:11,4:1,4:68,6	1,19	13,61	1,70	81,69
12	1: 7,1:4,3:50	1,52	10,86	6,52	76,08
Композиція, отримана за способом-прототипом					
13	1:26,7:7,4:103,7	0,72	19,22	5,33	74,72

* вміст кріопротектора (допоміжна фармацевтична речовина) взято за уведеною
кількістю

Таблиця 6

Ефективність заявлюваного способу і способу-прототипу за фармакологічною активністю отриманої за цими способами ліпосомальної
композиції цитохрому С за впливом на стан розвитку катаракти та біохімічні показники кришталика ока в моделі світлової катаракти

	Кількість очей із катарактою (%) на стадії:				Показники активності ферментів та вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у кришталику ¹⁾				
	1	2	3	4	МДА, нмоль/мл	ДК, нмоль/мл	Каталаза, мккат/мл	ЛДГ, мккат/мл	КФ, нкат/л
Вихідний рівень показника (норма)	0	0	0	0	8,1	1,9	43,1	12,2	14,9
Опромінення (26 тижнів) без лікування (фізіологічний розчин - 6 тижнів)									
Негативний контроль	0	0	50	50	13,8	3,2	26,0	16,2	25,1
Опромінення (26 тижнів)+введення наступних продуктів (6 тижнів):									
Композиція, що пропонується, отримана за заявлюваним способом (приклади) *) **									
1	25,0	75,0	0	0	9,6	2,4	36,1	13,2	16,0
5	25,0	75,0	0	0	8,8	2,0	40,1	12,9	15,5
7	12,5	87,5	0	0	9,0	2,1	38,0	12,6	16,5
11	0	87,5	12,5	0	10,2	2,7	32,0	14,0	19,1
Композиція за способом-прототипом *) **									
13	0	87,5	12,5	0	10,8	2,8	31,1	14,1	20,0
Препарат-аналог *									
Офтан Катахром	0	87,5	12,5	0	11,5	2,7	29,9	14,6	21,8

1) МДА – малоновий діальдегід; ДК – дієнові кон'югати; ЛДГ – лактатдегідрогеназа; КФ – кисла фосфатаза.

* p < 0.05 у порівнянні із вихідним рівнем показнику

** p < 0.05 у порівнянні із контролем

Таблиця 7

Ефективність заявлюваного способу і способу-прототипу за фармакологічною активністю отриманої за цими способами ліпосомальної композиції цитохрому С щодо її впливу на показники гемостатичної системи згортання крові при гострій масивній крововтраті (ГМК)

	Показники системи згортання крові ¹⁾				Показники кислотно-лужного стану і газообміну крові ²⁾				
	АПТЧ	ПЧ	ТЧ	ФГ	pH	pCO ₂	HCO ₃ ⁻	O ₂ Sat	ВВ
Вихідне значення (до ГМК)	39,4	41,0	47,2	2,07	7,465	38,2	22,52	99,29	46,9
ГМК (30%) *	29,0	28,1	43,2	1,67	7,222	34,64	17,37	90,40	38,8
ГМК+композиція, отримана за заявлюваним способом (приклади) *) **)									
1	33,7	39,6	48,0	1,99	7,442	36,64	24,21	99,34	49,34
3	34,6	39,2	47,0	1,98	7,415	36,85	24,0	99,20	47,95
4	33,8	40,0	48,0	2,0	7,450	37,44	23,65	99,0	46,02
8	37,9	40,5	48,2	2,02	7,460	37,70	24,10	99,61	48,30
9	32,5	36,5	46,3	1,89	7,341	36,0	21,75	97,20	45,26
ГМК + композиція за способом-прототипом *) **)									
13	32,4	36,6	46,8	1,90	7,345	36,0	21,80	96,40	44,49
ГМК+препарат-аналог *									
Цитохром С	30,1	31,1	45,8	1,81	7,301	35,38	18,47	92,06	41,27

1) АПТЧ – активований парціальний тромбопластиновий час, с;

ПЧ – протромбіновий час, с; ТЧ - тромбіновий час, с;

ФГ – фібриноген, г/л.

2) pCO₂ – парціальна напруга CO₂, мм.рт.ст.;

O₂Sat – насиченість крові киснем, %;

HCO₃⁻ - бікарбонат плазми, ммоль/л

ВВ – загальна кількість аніонів у крові, ммоль/л.

* p < 0,05 у порівнянні із вихідним значенням показника

** p < 0,05 у порівнянні із групою ГМК

Таблиця 8

Ефективність заявлюваного способу і способу-прототипу за фармакологічною активністю отриманої за цими способами ліпосомальної композиції цитохрому С при гіпоксії різної етіології та наркотичній інтоксикації

	Показники фармакологічної активності в моделях патологій:			
	Тривалість життя при гіпоксії, хв/% *			Тривалість сну при наркотичній інтоксикації, хв/% *
	Гіпоксія нормобарична	Гіпоксія гемічна	Гіпоксія тканинна	
Композиція, отримана за заявленим способом (приклад):				
1	119,8/48,5	16,9/53,6	15,2/60,0	45,0/38,6
2	119,0/47,5	16,7/51,8	15,1/58,9	44,8/38,9
3	122,1/51,3	17,3/57,2	15,8/66,3	44,0/40,0
4	119,0/47,5	16,6/50,9	15,2/60,0	44,5/39,3
5	122,4/51,7	17,0/54,5	15,7/65,3	44,1/39,8
6	123,0/52,4	17,4/58,2	16,0/68,4	44,0/40,0
7	119,1/47,6	16,8/52,7	15,7/65,3	44,8/38,9
8	119,6/48,2	16,7/51,8	15,8/66,3	44,1/39,8
9	108,1/33,9	15,5/40,9	13,9/46,3	49,0/33,1
10	109,3/35,4	16,0/45,5	14,2/49,5	48,9/33,3
Композиція, отримана за способом-прототипом				
13	106,5/31,9	15,3/40,1	13,9/46,3	55,3/24,5
Цитохром С - аналог	98,9/22,6	14,8/34,5	13,3/39,5	61,0/16,8
Контроль – фізіологічний розчин	80,7/-	11,0/-	9,5/-	73,3/-

* хв/%хв – абсолютне значення показника у хвилиналих;

% зміна показника щодо контрольної групи у процентах.

p < 0,05 у порівнянні із контролем

5 Джерела інформації:

1. Salem F.R. // Ann. Review of biochemistry. – 1977. – V. 46. – P.299-329.

2. Дроговоз С.М. Фармакологія (Підручник-довідник), Харків, 2007, С. 216-222.

3. Niesmann M.G. // Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst...-2002.- N 9.- P.1-38.

10 4. Hossen M., Kajimoto K., Anita H. et al //Molecular Therapy.-2013.-V.21, N 3. – P. 533-541

5. Liposome technology & liposome preparation/ ed. G.Gregoriadis.-2007.- CRC Press, Informa Healthcare.-324 p.

6. Ebrahim Sh., Peyman G., Lee P. //Survey of ophtalmology. – 2005.-V.50, N 2.- P.167-181

7. Zhang J., Guan P., Wang T. et al //J. Pharmacy and Pharmacology, 2009. – V.61, N 9. – P.1171-1178.

8. Nantes I., Kawai C., Pessoto K., Muqno K. // Methods Mol.Biol. 2010. – V. 606, N 3. – P.147-165.

9. Zavada Z.H. //Acta Polon. Pharm & Drug Res., 2012. – V.69, N 1. – P. 107-111.

10. Патент UA 44318 на корисну модель "Спосіб одержання ліпосомального цитохрому С", А61К 9/00. Опубл. 25.09.2009.

11. Патент RU 2110990 на изобретение "Липосомальная везикула с Цитохромом С", А61К9/127. Дата публикации 20.05.1998.

12. Заявка CN 101019836 на винахід "Nanometer cytochrome liposome medicine and its preparation", А61К38/06; А61К38/17; А61К47/24; А61К47/34; А61К47/42; А61К9/127; А61К9/19; А61Р39/02; А61Р43/00. Опубл. 22.08.2007.

13. Заявка EA201201592 на изобретение "Способ получения липосомальной формы цитохрома С", А61К38/00; А61К47/44; А61К9/127; А61Р27/02, опубл. 30.06.2014.

14. Каталог ліпідів. Lipoid E PS S, Німеччина

15. Цитохром С. Farmasino Pharm. (Jiangsu) Co., Китай

20 16. Цитохром С. Calzyme Lab. Inc, США

17. Метелицина І.П. //Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології.- Київ-Луганськ-Харків: Планета копі.- 2000.- Вип. 3(29).- С. 221-233

18. Експериментальне вивчення нешкідливості та фармакологічної активності очних лікарських засобів. Методичні рекомендації ДФЦ МОЗ України // Київ, 2003. – 43 с.

25 19. Fulop A., Turoczi Z., Garbaisz D. et al// Europ.Surgical Res...- 2013. – N 50.- P.57-70.

20. Levi M. Guidelines for diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation //British J. of Hematology. – 2009. – N 145. – P.23-33.

21. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ//2-е изд. под ред. Р.У.Хабриева. – М.: Изд-во Медицина, 2005. – 455 с.

22. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986: Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи).

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції шляхом створення суміші розчинів ліпідів в органічних розчинниках, її висушування у вакуумі та емульгування у водному середовищі, що містить цитохром С, диспергування емульсії із додаванням кріопротектора, з наступною фільтрацією, стерилізуючою фільтрацією та ліофілічним висушуванням, який **відрізняється** тим, що як ліпіди використовують фосфатидилхолін, вибраний серед фосфатидилхоліну яєчного або фосфатидилхоліну соєвого, у суміші зі щонайбільше двома іншими ліпідами, вибраними з групи, яка включає дипальмітоїлфосфатидилгліцерин, дистеароїлфосфатидилхолін, дифосфатидилгліцерин, фосфатидилгліцерин, фосфатидилінозит або діолеоїлоксипропілтриметиламоній при масовому співвідношенні фосфатидилхолін:інші ліпіди 0,3-2,0:1, для створення суміші розчинів ліпідів фосфатидилхолін розчиняють в етиловому спирті, а інші ліпіди - у хлороформі при об'ємному співвідношенні в суміші розчинів етиловий спирт:хлороформ 1:1,5-2,5, емульгування проводять при масовому співвідношенні цитохром С:ліпіди 1:11,4-18,5, додаючи до водного середовища розчин кріопротектора, що містить 60-80 мас. % від загальної кількості кріопротектора, який являє собою олігоцукор, вибраний з ряду, що включає лактозу, трегалозу, цукрозу, диспергування здійснюють при поетапному підвищенні тиску від 300 атм до 800 атм, після диспергування до емульсії додають розчин кріопротектора, що містить 40-20 мас. % від загальної кількості кріопротектора, а масове співвідношення суміш ліпідів:кріопротектор становить 1:5,5-7,2.

2. Фармакологічно активна ліпосомальна композиція, що містить цитохром С, суміш ліпідів та кріопротектор, яка **відрізняється** тим, що суміш ліпідів включає фосфатидилхолін, вибраний серед фосфатидилхоліну яєчного або фосфатидилхоліну соєвого та щонайбільше два інші ліпіди, вибрані з групи, яка включає дипальмітоїлфосфатидилгліцерин, дистеароїлфосфатидилхолін, дифосфатидилгліцерин,

фосфатидилгліцерин, фосфатидилінозит або діолеоїлоксипропілтриметиламоній, а кріопротектор являє собою олігоцукор, вибраний з ряду, що включає лактозу, трегалозу, цукрозу, при цьому масове співвідношення цитохром С:фосфатидилхолін:інші ліпіди:кріопротектор становить (0,81-1,06):(3,03-8,26):(4,13-9,88):(78,67-83,30) мас. %.

- 5 3. Композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що має антикатарактальну дію.
4. Композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що має здатність до відновлення гемостатичної системи згортання крові при гострій масивній крововтраті.
5. Композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що має антигіпоксичну та антиоксидантну дію.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601